



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 38 050.6

Anmeldetag: 02. August 2000

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Erstanmelder: Degussa-Hüls Aktien-
gesellschaft, Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Neue für das methH-Gen kodierende
Nukleotidsequenzen

IPC: C 07 H, C 12 P, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. Juni 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weihmayer

Neue für das methH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das methH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, unter Verwendung von Bakterien, in denen das methH-Gen verstärkt wird.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellungsverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. die Methionin-Analoga α -Methyl-Methionin, Ethionin, Norleucin, N-acetylnorleucin, S-Trifluoromethylhomocystein, 2-amino-5-heprenoitsäure, Seleno-Methionin, Methioninsulfoximin, Methoxin, 1-Aminocyclopentan-Carboxylsäure oder auxotroph

für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren wie z.B. L-Methionin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-
5 Aminosäure produzierender Stämme von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

- 10 Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 15 Werden im folgenden L-Methionin oder Methionin erwähnt, sind damit auch die Salze wie z.B. Methionin-Hydrochlorid oder Methion-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das methH-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der
20 Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine
25 Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der
5 Homocystein-Methyltransferase II aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte
Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine
replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 10 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder
- 15 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
(i) oder (ii) komplementären Sequenz
hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

ein Polynukleotid enthaltend die Nukleo-
20 tidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2
dargestellt, enthält

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid,
25 insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und

als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die den
Vektor enthalten oder in denen das methH-Gen verstärkt
ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit
5 der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind als
10 Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für Homocystein-Methyltransferase II kodieren, oder um solche Nukleinsäuren bzw. Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der
15 Sequenz mit der des Homocystein-Methyltransferase II-Gens aufweisen.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann,
20 die für Homocystein-Methyltransferase II kodieren.

Solche, als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide, enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit
25 einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es
30 sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Homocystein-Methyltransferase II und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders die zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren, und in denen die für das methH-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

- 5 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
 Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
 Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
 Corynebacterium melassecola ATCC17965
 Brevibacterium flavum ATCC14067
10 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
 Brevibacterium divaricatum ATCC14020

oder daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme, wie beispielsweise der L-Methionin produzierende Stamm

- 15 *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608.

Den Erfindern gelang es, das neue, für das Enzym Homocystein-Methyltransferase II (EC 2.1.1.13) kodierende *methH*-Gen von *C. glutamicum* zu isolieren.

- 20 Zur Isolierung des *methH*-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine
25 Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank
30 ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al.,

1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326)
5 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pH79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979))
10 oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5αmcr, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences
15 USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of
20 the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von
25 Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Auf diese Weise wurde die neue für das Gen methH kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID No.
30 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des methH-Genproduktes
35 dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID

5 No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner

10 grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann

15 unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der

20 Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der

25 Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

30 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.

35 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991))

41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des methH-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, produzieren.

10 Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise
15 wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Methionin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert.
20 Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin
25 eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei
30 Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei
35 Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei

- Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.
- 10 Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße methH-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., 15 Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4 (US-A 20 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.
- Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe 25 derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons 30 beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), 35 pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73

(1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

Zusätzlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin vorteilhaft sein, neben dem meth-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken.

So kann beispielsweise für die Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *gap* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen *tpi* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 5 • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (ACCESSION Number P26512),
- das für die Homoserin O-Acetyltransferase kodierende Gen metA (ACCESSION Number AF052652),
- 10 • das für die Cystathionin-gamma-Synthase kodierende Gen metB (ACCESSION Number AF126953),
- das für die Cystathionin-gamma-Lyase kodierende Gen aecD (ACCESSION Number M89931)
- das für die Serin-Hydroxymethyltransferase kodierende Gen glyA (JP-A-08107788),
- 15 • das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase kodierende Gen metY (DSM 13556)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

- Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur
- 20 Verstärkung des methH Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen thrB (ACCESSION Number P08210),
- das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen ilvA (ACCESSION Number Q04513),
- 25 • das für die Threonin Synthase kodierende Gen thrC (ACCESSION Number P23669),

- das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase kodierende Gen ddh (ACCESSION Number Y00151),
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
- 5 • das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478; DSM 12969),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE: 1995 1975.7; DSM 13114)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- 10 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, vorteilhaft sein, neben der Überexpression des methH-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: Overproduction of Microbial Products,
- 15 Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder
- 20 repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik
- 25 (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

- Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen
- 30 von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der

American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie

z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Methionin kann durch Ionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Methionin.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert.

- Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.
- Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

30 Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des methH-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem

Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems

(Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 3662 Basenpaaren, welches als methH-Gen bezeichnet wurde. Das methH-Gen kodiert für ein Protein von 1221 Aminosäuren.

	ttt gag gcg gga gct gac ttg gtt gag acc aat act ttt ggt tgc aac	651
	Phe Glu Ala Gly Ala Asp Leu Val Glu Thr Asn Thr Phe Gly Cys Asn	
	75 80 85	
5	ctg ccg aac ttg gcg gat tat gac atc gct gat cgt tgc cgt gag ctt	699
	Leu Pro Asn Leu Ala Asp Tyr Asp Ile Ala Asp Arg Cys Arg Glu Leu	
	90 95 100 105	
10	gcc tac aag ggc act gca gtg gct agg gaa gtg gct gat gag atg ggg	747
	Ala Tyr Lys Gly Thr Ala Val Ala Arg Glu Val Ala Asp Glu Met Gly	
	110 115 120	
15	ccg ggc cga aac ggc atg cgg cgt ttc gtg gtt ggt tcc ctg gga cct	795
	Pro Gly Arg Asn Gly Met Arg Arg Phe Val Val Gly Ser Leu Gly Pro	
	125 130 135	
20	gga acg aag ctt cca tcg ctg ggc cat gca ccg tat gca gat ttg cgt	843
	Gly Thr Lys Leu Pro Ser Leu Gly His Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Arg	
	140 145 150	
25	ggg cac tac aag gaa gca gcg ctt ggc atc atc gac ggt ggt ggc gat	891
	Gly His Tyr Lys Glu Ala Leu Gly Ile Ile Asp Gly Gly Gly Asp	
	155 160 165	
30	gcc ttt ttg att gag act gct cag gac ttg ctt cag gtc aag gct gcg	939
	Ala Phe Leu Ile Glu Thr Ala Gln Asp Leu Leu Gln Val Lys Ala Ala	
	170 175 180 185	
35	gtt cac ggc gtt caa gat gcc atg gct gaa ctt gat aca ttc ttg ccc	987
	Val His Gly Val Gln Asp Ala Met Ala Glu Leu Asp Thr Phe Leu Pro	
	190 195 200	
40	att att tgc cac gtc acc gta gag acc acc ggc acc atg ctc atg ggt	1035
	Ile Ile Cys His Val Thr Val Glu Thr Thr Gly Thr Met Leu Met Gly	
	205 210 215	
45	tct gag atc ggt gcc gcg ttg aca gcg ctg cag cca ctg ggt atc gac	1083
	Ser Glu Ile Gly Ala Ala Leu Thr Ala Leu Gln Pro Leu Gly Ile Asp	
	220 225 230	
50	atg att ggt ctg aac tgc gcc acc ggc cca gat gag atg agc gag cac	1131
	Met Ile Gly Leu Asn Cys Ala Thr Gly Pro Asp Glu Met Ser Glu His	
	235 240 245	
55	ctg cgt tac ctg tcc aag cac gcc gat att cct gtg tgc gtg atg cct	1179
	Leu Arg Tyr Leu Ser Lys His Ala Asp Ile Pro Val Ser Val Met Pro	
	250 255 260 265	
60	aac gca ggt ctt cct gtc ctg ggt aaa aac ggt gca gaa tac cca ctt	1227
	Asn Ala Gly Leu Pro Val Leu Gly Lys Asn Gly Ala Glu Tyr Pro Leu	
	270 275 280	
65	gag gct gag gat ttg gcg cag gcg ctg gct gga ttc gtc tcc gaa tat	1275
	Glu Ala Glu Asp Leu Ala Gln Ala Leu Ala Gly Phe Val Ser Glu Tyr	
	285 290 295	
70	ggc ctg tcc atg gtg ggt ggt tgt tgt ggc acc aca cct gag cac atc	1323
	Gly Leu Ser Met Val Gly Gly Cys Cys Gly Thr Thr Pro Glu His Ile	
	300 305 310	

	cgt	gcg	gtc	cgc	gat	gcg	gtg	gtt	ggt	gtt	cca	gag	cag	gaa	acc	tcc	1371
	Arg	Ala	Val	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Gly	Val	Pro	Glu	Gln	Glu	Thr	Ser	
		315					320					325					
5	aca	ctg	acc	aag	atc	cct	gca	ggc	cct	gtt	gag	cag	gcc	tcc	cgc	gag	1419
	Thr	Leu	Thr	Lys	Ile	Pro	Ala	Gly	Pro	Val	Glu	Gln	Ala	Ser	Arg	Glu	
		330				335					340					345	
10	gtg	gag	aaa	gag	gac	tcc	gtc	gcg	tgc	ctg	tac	acc	tcg	gtg	cca	ttg	1467
	Val	Glu	Lys	Glu	Asp	Ser	Val	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ser	Val	Pro	Leu	
					350					355					360		
15	tcc	cag	gaa	acc	ggc	att	tcc	atg	atc	ggt	gag	cgc	acc	aac	tcc	aac	1515
	Ser	Gln	Glu	Thr	Gly	Ile	Ser	Met	Ile	Gly	Glu	Arg	Thr	Asn	Ser	Asn	
				365					370					375			
20	ggt	tcc	aag	gca	ttc	cgt	gag	gca	atg	ctg	tct	ggc	gat	tgg	gaa	aag	1563
	Gly	Ser	Lys	Ala	Phe	Arg	Glu	Ala	Met	Leu	Ser	Gly	Asp	Trp	Glu	Lys	
			380					385					390				
25	tgt	gtg	gat	att	gcc	aag	cag	caa	acc	cgc	gat	ggt	gca	cac	atg	ctg	1611
	Cys	Val	Asp	Ile	Ala	Lys	Gln	Gln	Thr	Arg	Asp	Gly	Ala	His	Met	Leu	
		395					400					405					
30	gat	ctt	tgt	gtg	gat	tac	gtg	gga	cga	gac	ggc	acc	gcc	gat	atg	gcg	1659
	Asp	Leu	Cys	Val	Asp	Tyr	Val	Gly	Arg	Asp	Gly	Thr	Ala	Asp	Met	Ala	
		410				415					420					425	
35	acc	ttg	gca	gca	ctt	ctt	gct	acc	agc	tcc	act	ttg	cca	atc	atg	att	1707
	Thr	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Ser	Ser	Thr	Leu	Pro	Ile	Met	Ile	
					430					435					440		
40	gac	tcc	acc	gag	cca	gag	gtt	att	cgc	aca	ggc	ctt	gag	cac	ttg	ggt	1755
	Asp	Ser	Thr	Glu	Pro	Glu	Val	Ile	Arg	Thr	Gly	Leu	Glu	His	Leu	Gly	
				445					450					455			
45	gga	cga	agc	atc	gtt	aac	tcc	gtc	aac	ttt	gaa	gac	ggc	gat	ggc	cct	1803
	Gly	Arg	Ser	Ile	Val	Asn	Ser	Val	Asn	Phe	Glu	Asp	Gly	Asp	Gly	Pro	
			460					465					470				
50	gag	tcc	cgc	tac	cag	cgc	atc	atg	aaa	ctg	gta	aag	cag	cac	ggt	gcg	1851
	Glu	Ser	Arg	Tyr	Gln	Arg	Ile	Met	Lys	Leu	Val	Lys	Gln	His	Gly	Ala	
		475					480					485					
55	gcc	gtg	gtt	gcg	ctg	acc	att	gat	gag	gaa	ggc	cag	gca	cgt	acc	gct	1899
	Ala	Val	Val	Ala	Leu	Thr	Ile	Asp	Glu	Glu	Gly	Gln	Ala	Arg	Thr	Ala	
		490				495					500					505	
60	gag	cac	aag	gtg	cgc	att	gct	aaa	cga	ctg	att	gac	gat	atc	acc	ggc	1947
	Glu	His	Lys	Val	Arg	Ile	Ala	Lys	Arg	Leu	Ile	Asp	Asp	Ile	Thr	Gly	
					510					515					520		
65	agc	tac	ggc	ctg	gat	atc	aaa	gac	atc	gtt	gtg	gac	tgc	ctg	acc	ttc	1995
	Ser	Tyr	Gly	Leu	Asp	Ile	Lys	Asp	Ile	Val	Val	Asp	Cys	Leu	Thr	Phe	
				525					530					535			
70	ccg	atc	tct	act	ggc	cag	gaa	gaa	acc	agg	cga	gat	ggc	att	gaa	acc	2043
	Pro	Ile	Ser	Thr	Gly	Gln	Glu	Glu	Thr	Arg	Arg	Asp	Gly	Ile	Glu	Thr	
				540				545					550				

	atc gaa gcc atc cgc gag ctg aag aag ctc tac cca gaa atc cac acc	2091
	Ile Glu Ala Ile Arg Glu Leu Lys Lys Leu Tyr Pro Glu Ile His Thr	
	555 560 565	
5	acc ctg ggt ctg tcc aat att tcc ttc ggc ctg aac cct gct gca cgc	2139
	Thr Leu Gly Leu Ser Asn Ile Ser Phe Gly Leu Asn Pro Ala Ala Arg	
	570 575 580 585	
10	cag gtt ctt aac tct gtg ttc ctc aat gag tgc att gag gct ggt ctg	2187
	Gln Val Leu Asn Ser Val Phe Leu Asn Glu Cys Ile Glu Ala Gly Leu	
	590 595 600	
15	gac tct gcg att gcg cac agc tcc aag att ttg ccg atg aac cgc att	2235
	Asp Ser Ala Ile Ala His Ser Ser Lys Ile Leu Pro Met Asn Arg Ile	
	605 610 615	
20	gat gat cgc cag cgc gaa gtg gcg ttg gat atg gtc tat gat cgc cgc	2283
	Asp Asp Arg Gln Arg Glu Val Ala Leu Asp Met Val Tyr Asp Arg Arg	
	620 625 630	
25	acc gag gat tac gat ccg ctg cag gaa ttc atg cag ctg ttt gag ggc	2331
	Thr Glu Asp Tyr Asp Pro Leu Gln Glu Phe Met Gln Leu Phe Glu Gly	
	635 640 645	
30	gtt tct gct gcc gat gcc aag gat gct cgc gct gaa cag ctg gcc gct	2379
	Val Ser Ala Ala Asp Ala Lys Asp Ala Arg Ala Glu Gln Leu Ala Ala	
	650 655 660 665	
35	atg cct ttg ttt gag cgt ttg gca cag cgc atc atc gac ggc gat aag	2427
	Met Pro Leu Phe Glu Arg Leu Ala Gln Arg Ile Ile Asp Gly Asp Lys	
	670 675 680	
40	aat ggc ctt gag gat gat ctg gaa gca ggc atg aag gag aag tct cct	2475
	Asn Gly Leu Glu Asp Asp Leu Glu Ala Gly Met Lys Glu Lys Ser Pro	
	685 690 695	
45	att gcg atc atc aac gag gac ctt ctc aac ggc atg aag acc gtg ggt	2523
	Ile Ala Ile Ile Asn Glu Asp Leu Leu Asn Gly Met Lys Thr Val Gly	
	700 705 710	
50	gag ctg ttt ggt tcc gga cag atg cag ctg cca ttc gtg ctg caa tcg	2571
	Glu Leu Phe Gly Ser Gly Gln Met Gln Leu Pro Phe Val Leu Gln Ser	
	715 720 725	
55	gca gaa acc atg aaa act gcg gtg gcc tat ttg gaa ccg ttc atg gaa	2619
	Ala Glu Thr Met Lys Thr Ala Val Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Met Glu	
	730 735 740 745	
60	gag gaa gca gaa gct acc gga tct gcg cag gca gag ggc aag ggc aaa	2667
	Glu Glu Ala Glu Ala Thr Gly Ser Ala Gln Ala Glu Gly Lys Gly Lys	
	750 755 760	
65	atc gtc gtg gcc acc gtc aag ggt gac gtg cac gat atc ggc aag aac	2715
	Ile Val Val Ala Thr Val Lys Gly Asp Val His Asp Ile Gly Lys Asn	
	765 770 775	
70	ttg gtg gac atc att ttg tcc aac aac ggt tac gac gtg gtg aac ttg	2763
	Leu Val Asp Ile Ile Leu Ser Asn Asn Gly Tyr Asp Val Val Asn Leu	
	780 785 790	

	ggc atc aag cag cca ctg tcc gcc atg ttg gaa gca gcg gaa gaa cac	2811
	Gly Ile Lys Gln Pro Leu Ser Ala Met Leu Glu Ala Ala Glu Glu His	
	795 800 805	
5	aaa gca gac gtc atc ggc atg tgc gga ctt ctt gtg aag tcc acc gtg	2859
	Lys Ala Asp Val Ile Gly Met Ser Gly Leu Leu Val Lys Ser Thr Val	
	810 815 820 825	
10	gtg atg aag gaa aac ctt gag gag atg aac aac gcc ggc gca tcc aat	2907
	Val Met Lys Glu Asn Leu Glu Glu Met Asn Asn Ala Gly Ala Ser Asn	
	830 835 840	
15	tac cca gtc att ttg ggt ggc gct gcg ctg acg cgt acc tac gtg gaa	2955
	Tyr Pro Val Ile Leu Gly Gly Ala Ala Leu Thr Arg Thr Tyr Val Glu	
	845 850 855	
20	aac gat ctc aac gag gtg tac acc ggt gag gtg tac tac gcc cgt gat	3003
	Asn Asp Leu Asn Glu Val Tyr Thr Gly Glu Val Tyr Tyr Ala Arg Asp	
	860 865 870	
25	gct ttc gag ggc ctg cgc ctg atg gat gag gtg atg gca gaa aag cgt	3051
	Ala Phe Glu Gly Leu Arg Leu Met Asp Glu Val Met Ala Glu Lys Arg	
	875 880 885	
30	ggt gaa gga ctt gat ccc aac tca cca gaa gct att gag cag gcg aag	3099
	Gly Glu Gly Leu Asp Pro Asn Ser Pro Glu Ala Ile Glu Gln Ala Lys	
	890 895 900 905	
35	aag aag gcg gaa cgt aag gct cgt aat gag cgt tcc cgc aag att gcc	3147
	Lys Lys Ala Glu Arg Lys Ala Arg Asn Glu Arg Ser Arg Lys Ile Ala	
	910 915 920	
40	gcg gag cgt aaa gct aat gcg gct ccc gtg att gtt ccg gag cgt tct	3195
	Ala Glu Arg Lys Ala Asn Ala Ala Pro Val Ile Val Pro Glu Arg Ser	
	925 930 935	
45	gat gtc tcc acc gat act cca acc gcg gca cca ccg ttc tgg gga acc	3243
	Asp Val Ser Thr Asp Thr Pro Thr Ala Ala Pro Pro Phe Trp Gly Thr	
	940 945 950	
50	gcg att gtc aag ggt ctg ccc ttg gcg gag ttc ttg ggc aac ctt gat	3291
	Arg Ile Val Lys Gly Leu Pro Leu Ala Glu Phe Leu Gly Asn Leu Asp	
	955 960 965	
55	gag cgc gcc ttg ttc atg ggg cag tgg ggt ctg aaa tcc acc cgc ggc	3339
	Glu Arg Ala Leu Phe Met Gly Gln Trp Gly Leu Lys Ser Thr Arg Gly	
	970 975 980 985	
60	aac gag ggt cca agc tat gag gat ttg gtg gaa act gaa ggc cga cca	3387
	Asn Glu Gly Pro Ser Tyr Glu Asp Leu Val Glu Thr Glu Gly Arg Pro	
	990 995 1000	
65	cgc ctg cgc tac tgg ctg gat cgc ctg aag tct gag ggc att ttg gac	3435
	Arg Leu Arg Tyr Trp Leu Asp Arg Leu Lys Ser Glu Gly Ile Leu Asp	
	1005 1010 1015	
70	cac gtg gcc ttg gtg tat ggc tac ttc cca gcg gtc gcg gaa ggc gat	3483
	His Val Ala Leu Val Tyr Gly Tyr Phe Pro Ala Val Ala Glu Gly Asp	
	1020 1025 1030	

gac gtg gtg atc ttg gaa tcc ccg gat cca cac gca gcc gaa cgc atg 3531
 Asp Val Val Ile Leu Glu Ser Pro Asp Pro His Ala Ala Glu Arg Met
 1035 1040 1045

5 cgc ttt agc ttc cca cgc cag cag cgc ggc agg ttc ttg tgc atc gcg 3579
 Arg Phe Ser Phe Pro Arg Gln Gln Arg Gly Arg Phe Leu Cys Ile Ala
 1050 1055 1060 1065

10 gat ttc att cgc cca cgc gag caa gct gtc aag gac ggc caa gtg gac 3627
 Asp Phe Ile Arg Pro Arg Glu Gln Ala Val Lys Asp Gly Gln Val Asp
 1070 1075 1080

15 gtc atg cca ttc cag ctg gtc acc atg ggt aat cct att gct gat ttc 3675
 Val Met Pro Phe Gln Leu Val Thr Met Gly Asn Pro Ile Ala Asp Phe
 1085 1090 1095

20 gcc aac gag ttg ttc gca gcc aat gaa tac cgc gag tac ttg gaa gtt 3723
 Ala Asn Glu Leu Phe Ala Ala Asn Glu Tyr Arg Glu Tyr Leu Glu Val
 1100 1105 1110

cac ggc atc ggc gtg cag ctc acc gaa gca ttg gcc gag tac tgg cac 3771
 His Gly Ile Gly Val Gln Leu Thr Glu Ala Leu Ala Glu Tyr Trp His
 1115 1120 1125

25 tcc cga gtg cgc agc gaa ctc aag ctg aac gac ggt gga tct gtc gct 3819
 Ser Arg Val Arg Ser Glu Leu Lys Leu Asn Asp Gly Gly Ser Val Ala
 1130 1135 1140 1145

30 gat ttt gat cca gaa gac aag acc aag ttc ttc gac ctg gat tac cgc 3867
 Asp Phe Asp Pro Glu Asp Lys Thr Lys Phe Phe Asp Leu Asp Tyr Arg
 1150 1155 1160

35 ggc gcc cgc ttc tcc ttt ggt tac ggt tct tgc cct gat ctg gaa gac 3915
 Gly Ala Arg Phe Ser Phe Gly Tyr Gly Ser Cys Pro Asp Leu Glu Asp
 1165 1170 1175

40 cgc gca aag ctg gtg gaa ttg ctc gag cca ggc cgt atc ggc gtg gag 3963
 Arg Ala Lys Leu Val Glu Leu Leu Glu Pro Gly Arg Ile Gly Val Glu
 1180 1185 1190

ttg tcc gag gaa ctc cag ctg cac cca gag cag tcc aca gac gcg ttt 4011
 Leu Ser Glu Glu Leu Gln Leu His Pro Glu Gln Ser Thr Asp Ala Phe
 1195 1200 1205

45 gtg ctc tac cac cca gag gca aag tac ttt aac gtc taacaccttt 4057
 Val Leu Tyr His Pro Glu Ala Lys Tyr Phe Asn Val
 1210 1215 1220

50 gagagggaaa actttcccg acattgcaga tcgtgccact ttaactaagg ttgacggcat 4117
 gattaaggcg attttctggg acatggacgg cacgatggtg gactctgagc cacagtgggg 4177
 cattgctacc tacgagctca gcgaagccat gggccgccgc ctcaccccg agctccggga 4237

55 actcaccgtc ggctcgagcc tgccgcgcac catgcgctta tgcgagagc acgcaggcat 4297
 taca 4301

<210> 2
 <211> 1221
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

5

<400> 2
 Met Ser Thr Ser Val Thr Ser Pro Ala His Asn Asn Ala His Ser Ser
 1 5 10 15

10 Glu Phe Leu Asp Ala Leu Ala Asn His Val Leu Ile Gly Asp Gly Ala
 20 25 30

Met Gly Thr Gln Leu Gln Gly Phe Asp Leu Asp Val Glu Lys Asp Phe
 35 40 45

15

Leu Asp Leu Glu Gly Cys Asn Glu Ile Leu Asn Asp Thr Arg Pro Asp
 50 55 60

20

Val Leu Arg Gln Ile His Arg Ala Tyr Phe Glu Ala Gly Ala Asp Leu
 65 70 75 80

Val Glu Thr Asn Thr Phe Gly Cys Asn Leu Pro Asn Leu Ala Asp Tyr
 85 90 95

25

Asp Ile Ala Asp Arg Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Lys Gly Thr Ala Val
 100 105 110

Ala Arg Glu Val Ala Asp Glu Met Gly Pro Gly Arg Asn Gly Met Arg
 115 120 125

30

Arg Phe Val Val Gly Ser Leu Gly Pro Gly Thr Lys Leu Pro Ser Leu
 130 135 140

35

Gly His Ala Pro Tyr Ala Asp Leu Arg Gly His Tyr Lys Glu Ala Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Ile Ile Asp Gly Gly Gly Asp Ala Phe Leu Ile Glu Thr Ala
 165 170 175

40

Gln Asp Leu Leu Gln Val Lys Ala Ala Val His Gly Val Gln Asp Ala
 180 185 190

Met Ala Glu Leu Asp Thr Phe Leu Pro Ile Ile Cys His Val Thr Val
 195 200 205

45

Glu Thr Thr Gly Thr Met Leu Met Gly Ser Glu Ile Gly Ala Ala Leu
 210 215 220

50

Thr Ala Leu Gln Pro Leu Gly Ile Asp Met Ile Gly Leu Asn Cys Ala
 225 230 235 240

Thr Gly Pro Asp Glu Met Ser Glu His Leu Arg Tyr Leu Ser Lys His
 245 250 255

55

Ala Asp Ile Pro Val Ser Val Met Pro Asn Ala Gly Leu Pro Val Leu
 260 265 270

Gly Lys Asn Gly Ala Glu Tyr Pro Leu Glu Ala Glu Asp Leu Ala Gln
 275 280 285

	Ala	Leu	Ala	Gly	Phe	Val	Ser	Glu	Tyr	Gly	Leu	Ser	Met	Val	Gly	Gly	
	290						295					300					
5	Cys	Cys	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	His	Ile	Arg	Ala	Val	Arg	Asp	Ala	Val	
	305					310					315					320	
	Val	Gly	Val	Pro	Glu	Gln	Glu	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Lys	Ile	Pro	Ala	
					325					330					335		
10	Gly	Pro	Val	Glu	Gln	Ala	Ser	Arg	Glu	Val	Glu	Lys	Glu	Asp	Ser	Val	
				340					345					350			
	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Ser	Val	Pro	Leu	Ser	Gln	Glu	Thr	Gly	Ile	Ser	
15			355					360						365			
	Met	Ile	Gly	Glu	Arg	Thr	Asn	Ser	Asn	Gly	Ser	Lys	Ala	Phe	Arg	Glu	
	370						375					380					
20	Ala	Met	Leu	Ser	Gly	Asp	Trp	Glu	Lys	Cys	Val	Asp	Ile	Ala	Lys	Gln	
	385					390					395					400	
	Gln	Thr	Arg	Asp	Gly	Ala	His	Met	Leu	Asp	Leu	Cys	Val	Asp	Tyr	Val	
					405					410					415		
25	Gly	Arg	Asp	Gly	Thr	Ala	Asp	Met	Ala	Thr	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	
				420					425					430			
	Thr	Ser	Ser	Thr	Leu	Pro	Ile	Met	Ile	Asp	Ser	Thr	Glu	Pro	Glu	Val	
30				435				440					445				
	Ile	Arg	Thr	Gly	Leu	Glu	His	Leu	Gly	Gly	Arg	Ser	Ile	Val	Asn	Ser	
	450						455					460					
35	Val	Asn	Phe	Glu	Asp	Gly	Asp	Gly	Pro	Glu	Ser	Arg	Tyr	Gln	Arg	Ile	
	465					470					475					480	
	Met	Lys	Leu	Val	Lys	Gln	His	Gly	Ala	Ala	Val	Val	Ala	Leu	Thr	Ile	
					485				490						495		
40	Asp	Glu	Glu	Gly	Gln	Ala	Arg	Thr	Ala	Glu	His	Lys	Val	Arg	Ile	Ala	
				500					505					510			
	Lys	Arg	Leu	Ile	Asp	Asp	Ile	Thr	Gly	Ser	Tyr	Gly	Leu	Asp	Ile	Lys	
45			515					520					525				
	Asp	Ile	Val	Val	Asp	Cys	Leu	Thr	Phe	Pro	Ile	Ser	Thr	Gly	Gln	Glu	
	530						535					540					
50	Glu	Thr	Arg	Arg	Asp	Gly	Ile	Glu	Thr	Ile	Glu	Ala	Ile	Arg	Glu	Leu	
	545					550					555					560	
	Lys	Lys	Leu	Tyr	Pro	Glu	Ile	His	Thr	Thr	Leu	Gly	Leu	Ser	Asn	Ile	
					565					570					575		
55	Ser	Phe	Gly	Leu	Asn	Pro	Ala	Ala	Arg	Gln	Val	Leu	Asn	Ser	Val	Phe	
				580					585					590			
	Leu	Asn	Glu	Cys	Ile	Glu	Ala	Gly	Leu	Asp	Ser	Ala	Ile	Ala	His	Ser	
			595					600					605				

	Ser	Lys	Ile	Leu	Pro	Met	Asn	Arg	Ile	Asp	Asp	Arg	Gln	Arg	Glu	Val	
	610						615					620					
5	Ala	Leu	Asp	Met	Val	Tyr	Asp	Arg	Arg	Thr	Glu	Asp	Tyr	Asp	Pro	Leu	
	625					630					635					640	
	Gln	Glu	Phe	Met	Gln	Leu	Phe	Glu	Gly	Val	Ser	Ala	Ala	Asp	Ala	Lys	
					645					650					655		
10	Asp	Ala	Arg	Ala	Glu	Gln	Leu	Ala	Ala	Met	Pro	Leu	Phe	Glu	Arg	Leu	
				660					665					670			
	Ala	Gln	Arg	Ile	Ile	Asp	Gly	Asp	Lys	Asn	Gly	Leu	Glu	Asp	Asp	Leu	
			675					680					685				
15	Glu	Ala	Gly	Met	Lys	Glu	Lys	Ser	Pro	Ile	Ala	Ile	Ile	Asn	Glu	Asp	
	690						695					700					
20	Leu	Leu	Asn	Gly	Met	Lys	Thr	Val	Gly	Glu	Leu	Phe	Gly	Ser	Gly	Gln	
	705					710					715					720	
	Met	Gln	Leu	Pro	Phe	Val	Leu	Gln	Ser	Ala	Glu	Thr	Met	Lys	Thr	Ala	
					725					730					735		
25	Val	Ala	Tyr	Leu	Glu	Pro	Phe	Met	Glu	Glu	Glu	Ala	Glu	Ala	Thr	Gly	
				740					745					750			
	Ser	Ala	Gln	Ala	Glu	Gly	Lys	Gly	Lys	Ile	Val	Val	Ala	Thr	Val	Lys	
			755					760					765				
30	Gly	Asp	Val	His	Asp	Ile	Gly	Lys	Asn	Leu	Val	Asp	Ile	Ile	Leu	Ser	
	770						775					780					
	Asn	Asn	Gly	Tyr	Asp	Val	Val	Asn	Leu	Gly	Ile	Lys	Gln	Pro	Leu	Ser	
35	785					790					795					800	
	Ala	Met	Leu	Glu	Ala	Ala	Glu	Glu	His	Lys	Ala	Asp	Val	Ile	Gly	Met	
				805						810					815		
40	Ser	Gly	Leu	Leu	Val	Lys	Ser	Thr	Val	Val	Met	Lys	Glu	Asn	Leu	Glu	
			820						825					830			
	Glu	Met	Asn	Asn	Ala	Gly	Ala	Ser	Asn	Tyr	Pro	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	
			835					840					845				
45	Ala	Ala	Leu	Thr	Arg	Thr	Tyr	Val	Glu	Asn	Asp	Leu	Asn	Glu	Val	Tyr	
	850						855					860					
	Thr	Gly	Glu	Val	Tyr	Tyr	Ala	Arg	Asp	Ala	Phe	Glu	Gly	Leu	Arg	Leu	
50	865					870					875					880	
	Met	Asp	Glu	Val	Met	Ala	Glu	Lys	Arg	Gly	Glu	Gly	Leu	Asp	Pro	Asn	
				885						890					895		
55	Ser	Pro	Glu	Ala	Ile	Glu	Gln	Ala	Lys	Lys	Lys	Ala	Glu	Arg	Lys	Ala	
			900						905					910			
	Arg	Asn	Glu	Arg	Ser	Arg	Lys	Ile	Ala	Ala	Glu	Arg	Lys	Ala	Asn	Ala	
			915					920						925			

[illegible]

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus
der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2
enthält,
 - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID
No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
 - (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz
(i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert,
und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

- 5 6. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, das für ein
Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID
No. 2 darstellt, enthält.
7. Coryneforme Bakterien, in denen das methH-Gen verstärkt,
insbesondere überexprimiert wird.
- 10 8. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die
einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß
Anspruch 1 trägt.
- 15 9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren, insbesondere L-Methionin, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte
durchführt:
 - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man
zumindest das methH-Gen oder dafür kodierende
20 Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere
überexprimiert;
 - b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium
oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.
- 25 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des
Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure
verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der
gewünschten L-Aminosäure verringern.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem
Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der
Plasmidvektor die für das methH-Gen kodierende
Nukleotidsequenz trägt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des
(der) Polynukleotides (e), das (die) für das methH-Gen
kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere
überexprimiert.
14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die katalytischen
Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für
das das Polynukleotid methH kodiert.
15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,
coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe
- 15.1 das für eine feed back resistente
Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15.2 das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 15.3 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende
Gen pgk,

- 15.4 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 15.5 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende
Gen tpi
- 5 15.6 das für die Homoserin O-Acetyltransferase
kodierende Gen metA
- 15.7 das für die Cystahionin-gamma-Synthase
kodierende Gen metB
- 10 15.8 das für die Cystahionin-gamma-Lyase kodierende
Gen aecD
- 15.9 das für die Serin-Hydroxymethyltransferase
kodierende Gen glyA
- 15.10 das für die O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase
kodierende Gen metY
- 15
- verstärkt bzw. überexprimiert.
16. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren, insbesondere L-Methionin,
20 coryneformen Mikroorganismen fermentiert, in denen man
gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt
aus der Gruppe
- 16.1 das für die Homoserine - Kinase kodierende Gen
thrB
- 25 16.2 das für die Threonin Dehydratase kodierende Gen
ilvA
- 16.3 das für die Threonin Synthase kodierende Gen
thrC

- 16.4 das für die Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase
kodierende Gen ddh
- 16.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck
- 5 16.6 das für die Glucose-6-Phosphat6 Isomerase
kodierende Gen pgi
- 16.7 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- abschwächt.
- 10 17. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium
glutamicum einsetzt.
- 15 18. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene
zu isolieren, die für Homocystein-Methyltransferase II
kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des
Homocystein-Methyltransferase II Gens aufweisen,
dadurch gekennzeichnet, dass man die
- 20 Polynukleotidsequenzen gemäß Anspruch 1, 2, 3 oder 4
als Hybridisierungssonden einsetzt.

Neue für das methH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid,
enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der
5 Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit
einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine
Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%
identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No.
2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
Polynukleotiden von a) oder b), und

15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz
von a), b) oder c),

und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in
20 denen zumindest das methH-Gen verstärkt vorliegt, und die
Verwendung der Polynukleotidsequenzen als
Hybridisierungssonden.